

tRNA Import in Mitochondrien

Heike Betat¹ und Mario Mörl^{1,2}

¹Max-Planck-Institut für Evolutionäre Anthropologie und ²Institut für Biochemie, Universität Leipzig

► Aufgrund ihres endosymbiontischen Ursprungs besitzen Mitochondrien ein eigenes Erbgut und sind in der Lage, die darin codierten Proteine selbst zu synthetisieren. In den meisten Organismen besitzen sie einen vollständigen Satz an tRNAs, den sie zur Translation benötigen. Seit einigen Jahren häufen sich jedoch zunehmend Ausnahmen von dieser Regel: in vielen mitochondrialen Genomen fehlen einzelne oder mehrere tRNA-Gene. Die Mitochondrien importieren die fehlenden tRNA-Moleküle aus dem Zytoplasma über größtenteils noch unbekannte Mechanismen. Der aktuelle Wissensstand auf diesem Forschungsgebiet wird hier zusammenfassend dargestellt und eine mögliche Verwendung des tRNA-Imports bzw. seine Blockierung bei der Behandlung verschiedener Krankheiten aufgezeigt.

Mitochondrien sind Organellen, die der eukaryontischen Zelle nicht nur als „Kraftwerke“ dienen, indem sie durch oxidative Phosphorylierung Energie in Form von ATP bereitstellen – sie sind auch an einer Vielzahl weiterer Prozesse beteiligt, die von Apoptose bis hin zu Alterungs-Prozessen in höheren Eukaryonten reichen (ENTEELIS *et al.*, 2001).

Sie haben ihren Ursprung in bakteriellen Endosymbionten und besitzen daher ein eigenes Genom, das für eine geringe Anzahl von Proteinen codiert (13 beim Menschen, 32 bei *Arabidopsis*, (SCHNEIDER and MARÉCHAL-DROUARD, 2000). Diese Proteine stellen Komponenten der Atmungskette dar und sind essentiell für die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien. Alle anderen Proteine der Mitochondrien (bis zu 1000 verschiedene Strukturproteine, Enzyme, Transkriptions- und Translationsfaktoren) werden dagegen im Zellkern codiert, im Zytoplasma synthetisiert und ins Mitochondrium importiert (SCHEFFLER, 1999).

Die Synthese der Mitochondrien-eigenen Proteine erfordert eine Vielzahl struktureller RNAs (ribosomale RNAs und tRNAs), die normalerweise vom mitochondrialen Genom codiert werden (SCHNEIDER and MARÉCHAL-DROUARD, 2000). Bei einer Reihe von Organismen fehlen jedoch im Erbgut ihrer Mitochondrien für die Translation essentielle tRNA-Gene. Dennoch können diese Organellen Proteine synthetisieren, wie etwa beim Einzeller *Tetrahymena pyriformis*, in dessen mitochondrialem Genom

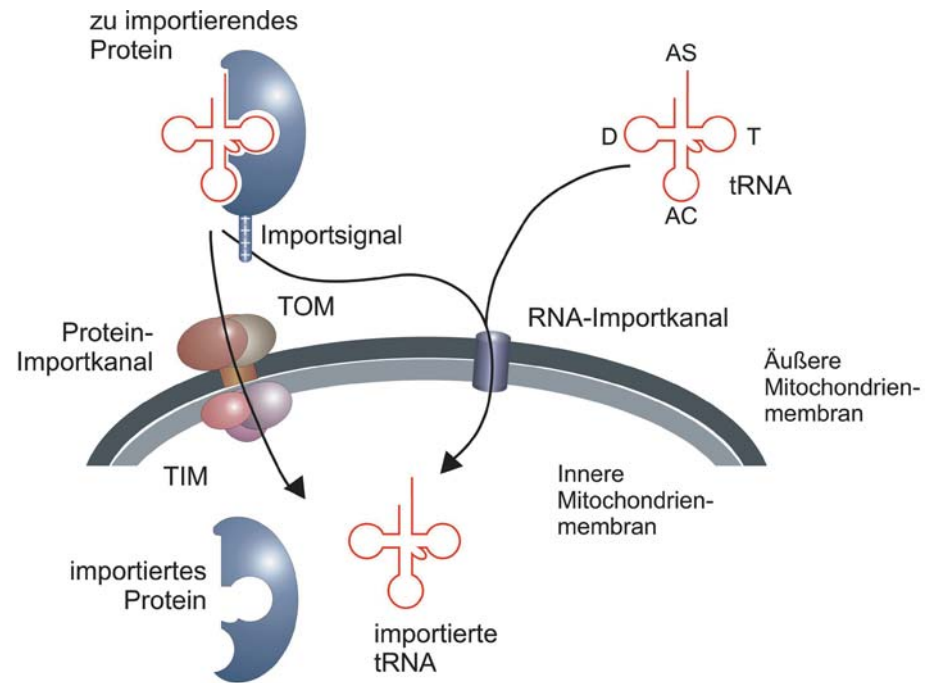


Abb. 1: nach Entelis *et al.*, 2001: Mögliche Wege des tRNA-Imports. Die tRNA könnte, mit zu importierenden Proteinen komplexiert, durch den Protein-Importkanal als „blinder Passagier“ ins Mitochondrium gelangen. Alternativ könnte die tRNA vom Protein abdiffundieren und von einem tRNA-Importsystem übernommen werden. Eine dritte Möglichkeit stellt die direkte Interaktion des tRNA-Importsystems mit der RNA dar.

Abkürzungen: TOM, translocase of outer membrane; TIM, translocase of inner membrane; AS, Akzeptorstamm; D, D-Arm; AC, Anticodon-Arm; T, T ψ C-Arm.

nahezu alle tRNA-Gene fehlen. Man nahm an, dass diese Spezies die fehlenden tRNAs aus dem Zytosol in Mitochondrien importieren (SUYAMA, 1967). Tatsächlich wurde bis heute der Import kerncodierter tRNAs in Mitochondrien für eine Vielzahl eukaryontischer Organismen beschrieben – das Spektrum reicht von Mikroorganismen über Pflanzen bis hin zu Säugetieren (DÖRNER *et al.*, 2001). Die Anzahl der importierten tRNAs variiert dabei von Art zu Art beträchtlich (Tabelle 1): während in der Bäckerhefe nur eine tRNA-Art importiert wird, sind es in höheren Pflanzen bis zu mehr als 11 tRNAs (Kartoffel, *Solanum tuberosum*). Bei verschiedenen Einzellern (*Trypanosoma brucei* und *Leishmania tarantolae*) betrifft es sogar den kompletten Satz an tRNAs (ENTEELIS *et al.*, 2001). Allen importierten tRNAs ist gemeinsam, dass sie vom Kern-Genom codiert und zwischen Zytoplasma und Mitochondrium verteilt werden. Dabei gelangt nur ein kleiner Prozentsatz dieser tRNAs (et-

wa 5%) in die Mitochondrien (SCHNEIDER and MARÉCHAL-DROUARD, 2000).

Während der mitochondriale Protein-Import gut verstanden ist (NEUPERT, 1997), ist wenig bekannt, wie hoch polare, negativ ge-

Organismus	importierte tRNAs
Trypanosomatiden <i>Leishmania</i> , <i>Trypanosoma</i>	alle
Pflanzen <i>Solanum</i>	bis über 11
Pilze <i>Saccharomyces</i>	1 (tRNA ^{lys})
Säugetiere (Beuteltiere) <i>Monodelphis</i> , <i>Didelphis</i>	1 (tRNA ^{lys})

Tab. 1: Auswahl von Organismen mit tRNA-Import: Während Trypanosomatiden (*Leishmania*- und *Trypanosoma*-Arten) und Landpflanzen (*Kartoffel* *Solanum tuberosum*) viele ihrer mitochondrialen tRNAs aus dem Zytoplasma importieren, ist es bei der Hefe (*Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae*) und Säugetieren (*Opossumarten Monodelphis*, *Didelphis*) nur eine einzige tRNA.

ladene tRNAs Mitochondrienmembranen passieren. Möglicherweise existieren RNA-spezifische, membranständige Rezeptoren und Translokationssysteme. Denkbar ist aber auch, dass tRNAs mit Proteinen co-importiert werden bzw. Proteine als *targeting*-Faktoren fungieren und die tRNAs zu speziellen RNA-Importkanälen dirigieren (ENTELES *et al.*, 2001) (Abb. 1). Daneben ist auch unklar, wie die Zelle eine zu importierende tRNA im Zytoplasma erkennt und von anderen tRNAs unterscheidet, die nicht ins Mitochondrium gelangen sollen.

In den letzten Jahren ist es nun gelungen, tRNA Import-Systeme *in vivo* und *in vitro* zu entwickeln. Ihre Ergebnisse zeigen, dass kein universeller Mechanismus (wie beim Proteinimport) existiert, sondern je nach Art unterschiedliche Importsysteme vorliegen (SCHNEIDER and MARÉCHAL-DROUARD, 2000; ENTELES *et al.*, 2001):

tRNA-Import in Protozoen

Die Existenz kerncodierter tRNAs in Mitochondrien wurde erstmals bei *T. pyriformis* nachgewiesen (SUYAMA, 1967). Hybridisierungsstudien ließen vermuten, dass tRNAs aus dem Zytoplasma ins Mitochondrium importiert werden, da ein Teil der aus Mitochondrien isolierten tRNAs nicht mit mitochondrialer, sondern mit nukleärer DNA hybridisierte.

Experimentelle Importsysteme bei Kinetoplastiden (zu denen Erreger der Schlafkrankheit (*Trypanosoma brucei*) und Erreger der Leishmaniose gehören (*Leishmania*-Arten)) ergaben teils widersprüchliche Ergebnisse, weisen jedoch auch gemeinsame Merkmale auf wie ATP-Abhängigkeit und die Beteiligung eines unbekanntem Protease-sensitiven Rezeptors auf der Mitochondrienoberfläche (ENTELES *et al.*, 2001).

Hinsichtlich der Erkennung der zu importierenden tRNAs gibt es zwischen *Trypanosoma* und *Leishmania* gravierende Unterschiede: In einem *in vitro* System aus isolierten Mitochondrien von *L. tarentolae* wurde gezeigt, dass der Einbau des D-Arms der zu importierenden tRNA für Isoleucin in die zytosol-spezifische tRNA für Glutamin dazu führte, dass diese tRNA in Mitochondrien importiert wurde (Abb. 2). Im reziproken Experiment verhinderte der D-Arm der zytosolischen tRNA den Import der Isoleucin-tRNA. Offensichtlich bestimmen Abschnitte der tRNAs die zytoplasmatische bzw. mitochondriale Lokalisation (RUBIO *et al.*, 2000). Da bei Trypanosomen hingegen keine derartigen Substratanforderungen gefunden wurden, bleibt die Frage offen, wie hier zwischen zu importierenden und zytosolischen tRNAs unterschieden wird. Möglicherweise haben sich verschiedene Er-

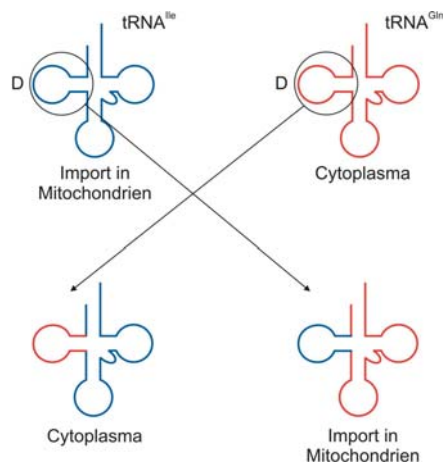


Abb. 2: Elemente der tRNA können für den mitochondrialen Import entscheidend sein: In *Leishmania tarentolae* trägt die zu importierende tRNA für Isoleucin ein noch nicht näher identifiziertes Importsignal im D-Arm (D). Wird dieser Arm gegen den Arm aus der zytoplasmatischen tRNA für Glutamin ausgetauscht, so erfolgt *in vitro* kein Import der Hybrid-tRNA. Wird der D-Arm der tRNA^{Ile} dagegen in die tRNA^{Gln} eingebaut, so wird nun diese tRNA importiert (Rubio *et al.* 2000).

kennungsmechanismen entwickelt, die auf speziellen tRNA-Strukturen und/oder Proteinfaktoren beruhen (SCHNEIDER and MARÉCHAL-DROUARD, 2000; ENTELES *et al.*, 2001).

Interessanterweise scheinen bei *T. brucei* keine reifen tRNAs, sondern Vorläufermoleküle mit flankierenden 5'-Sequenzen bzw. Primärtranskripte aus 2 tRNAs importiert zu werden, während bei *Leishmania* nur reife tRNA-Moleküle in die Mitochondrien gelangen (LEBLANC *et al.*, 1999). Bei derart widersprüchlichen Ergebnissen kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass einige auf Artefakte der verwendeten *in vitro* Systeme zurückzuführen sein könnten (ENTELES *et al.*, 2001).

Hefe: Import einer einzigen tRNA

Im Gegensatz zu Protozoen ist der tRNA-Import bei *S. cerevisiae* detailliert untersucht. Obwohl das mitochondriale Genom dieser Hefe für alle essentiellen tRNAs codiert, wird eine zytosolische Lysin-tRNA importiert. Da diese tRNA in Mitochondrien nicht aminoacyliert werden kann, ist die physiologische Bedeutung dieses Imports bislang unklar. Der Importmechanismus hingegen ist in seinen Grundzügen charakterisiert (TARASSOV *et al.*, 1995; TARASSOV and MARTIN, 1996).

Im Vergleich zu *T. brucei* ist hier ein funktionsfähiges Protein-Import-System sowie die Beteiligung der mitochondrialen und

zytoplasmatischen Lysyl-tRNA-Synthetasen erforderlich (MIREAU *et al.*, 2000). Zunächst wird die tRNA im Zytoplasma mit Lysin beladen. Diese Aminoacylierung führt vermutlich zu einem Konformationswechsel in der RNA, der dann eine Interaktion mit der ebenfalls zu importierenden mitochondrialen Lysyl-tRNA-Synthetase erlaubt (KOLESIKOVA *et al.*, 2000). Die beladene tRNA wird so mit dem Vorläuferprotein der Synthetase über die Protein-Import-Maschinerie als „blinder Passagier“ co-importiert (TARASSOV and MARTIN, 1996) (Abb. 1). Wie der Protein-Import ist auch dies ein aktiver Prozess, der unter ATP-Verbrauch abläuft und einen elektrochemischen Protonengradienten erfordert. Neben dem Vorläufer der mitochondrialen Lysyl-tRNA-Synthetase scheinen ein weiterer, noch nicht identifizierter zytosolischer Faktor sowie Bereiche der tRNA (Akzeptorstamm und Anticodon-Schleife, siehe Abb. 1) für die Spezifität des Imports notwendig zu sein (SCHNEIDER and MARÉCHAL-DROUARD, 2000).

Auch Pflanzen importieren tRNAs

Trotz der zum Teil beachtlichen Größe (200–2400 kb) codiert das mitochondriale Genom der Landpflanzen nur für einen unvollständigen Satz an tRNAs (GLOVER *et al.*, 2001). Man nahm daher an, dass auch in Pflanzen die fehlenden tRNAs nukleären Ursprungs sind und aus dem Zytoplasma importiert werden (ENTELES *et al.*, 2001).

Auch hier stellt der tRNA-Import einen hochspezifischen Prozess dar, der die Mitochondrien nur mit bestimmten tRNAs versorgt (TARASSOV and MARTIN, 1996). Da bislang keine tRNA-Bereiche als Import-Signale identifiziert wurden, nimmt man an, dass spezielle Faktoren existieren, die zwischen zytoplasmatischen und zu importierenden tRNAs unterscheiden. Vermutlich spielen – analog der Hefe – Aminoacyl-tRNA-Synthetasen eine Rolle, da mutierte, nicht aminoacylierbare tRNAs nicht importiert werden (DIETRICH *et al.*, 1996). Allerdings sind diese Enzyme allein nicht ausreichend für den Import, so dass die Beteiligung mindestens eines weiteren Faktors postuliert wird (MIREAU *et al.*, 2000).

Zu guter Letzt: tRNA-Import auch bei Säugetieren

Lange Zeit nahm man an, dass in Säugermitochondrien keine tRNAs importiert werden, da das mitochondriale Genom für einen vollständigen Satz von 22 tRNAs codiert (ENTELES *et al.*, 2001). Dagegen wurde bereits 1987 postuliert, dass andere RNA-Moleküle importiert werden: So ist die RNA-Untereinheit der RNase MRP, die für die

Replikation der mitochondrialen DNA von Bedeutung ist, nicht im mitochondrialen Genom codiert (CHANG and CLAYTON, 1987). Ein anderer Kandidat ist die RNA-Untereinheit der mitochondrialen RNase P – ein Enzym, das die 5'-Prozessierung von tRNAs bewerkstelligt (DOERSEN *et al.*, 1985): Während sie bei vielen Organismen im mitochondrialen Genom codiert ist, wurde ein entsprechendes Gen bei Säugern nicht gefunden. Der Import dieser RNA wird allerdings kontrovers diskutiert, da RNase P in menschlichen Mitochondrien offenbar ohne RNA-Komponente aktiv ist (ROSSMANITH and KARWAN, 1998). Eine weitere kerncodierte RNA, die sich in Säuger-Mitochondrien nachweisen lässt, ist die ribosomale 5S RNA, über deren mögliche Funktion in Mitochondrien bislang nichts bekannt ist (MAGALHAES *et al.*, 1998).

Entgegen früherer Auffassung, dass mitochondrialer Import von tRNAs auf Protozoen, Hefe und Pflanzen beschränkt ist, konnte vor kurzem eine kerncodierte tRNA für Lysin in Mitochondrien von Beuteltieren nachgewiesen werden. Basierend auf Sequenzvergleichen verschiedener mitochondrialer Genome von Beuteltieren nahm man an, dass es sich beim Gen für die Lysin-tRNA um ein Pseudogen handelt, das für eine nicht funktionsfähige tRNA codiert. Diese Hypothese konnte experimentell bestätigt werden: die einzige mit Lysin aminoacylierbare tRNA in Beuteltier-Mitochondrien wurde als eine kerncodierte Lysin-tRNA identifiziert – ein erster Beweis für den Import kerncodierter tRNAs in Mitochondrien von Säugetieren (DÖRNER *et al.*, 2001).

Ein universeller Prozess mit unterschiedlichen Mechanismen?

Da der mitochondriale tRNA-Import in einer Vielzahl unterschiedlicher Organismen nachgewiesen wurde, stellt er möglicherweise einen universellen Prozess dar (ENTELIS *et al.*, 2001). Trotz der Vielzahl der existierenden Daten ist es gegenwärtig jedoch nicht möglich, ein allgemeines Bild von den molekularen Mechanismen des tRNA-Transports zu entwerfen. Hinsichtlich der breiten evolutionären Verteilung des tRNA-Imports scheint es vielmehr, dass unterschiedliche Mechanismen in verschiedenen Organismen existieren (SCHNEIDER and MARÉCHAL-DROUARD, 2000; ENTELIS *et al.*, 2001). Trotz zahlreicher Abweichungen in den Systemen gibt es aber auch Gemeinsamkeiten: Der Vorgang ist ATP-abhängig und erfordert spezifische Rezeptoren auf der äußeren Mitochondrienmembran.

Anwendungen

Eine Vielzahl schwerer menschlicher Krankheiten wie *MERRF* (*Myoclonus Epilepsy with Ragged Red Fibers*) oder *MELAS* (*Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke-Like Episodes*) beruht auf Mutationen in mitochondrialen Protein- oder tRNA-Genen (SCHON *et al.*, 1997). Die Entwicklung eines tRNA-Import-Systems in menschlichen Zellen könnte genutzt werden, um derartige Gen-Defekte mittels eingeschleuster tRNAs zu kompensieren (SCHNEIDER and MARÉCHAL-DROUARD, 2000; ENTELIS *et al.*, 2001). Dies sollte prinzipiell möglich sein: Es gelang bereits, in *S. cerevisiae* eine *Non-sense*-Mutation im mitochondrialen *COX2*-Gen durch den Import einer Suppressor-Variante der tRNA^{Lys} zu kompensieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart eines noch nicht identifizierten Hefe-Import-Faktors auch menschliche Mitochondrien tRNA-Moleküle aufnehmen können (KOLESNIKOVA *et al.*, 2000).

Eine weitere Anwendung könnte sich in der Bekämpfung pathogener *Trypanosoma*- und *Leishmania*-Arten ergeben, die vom Import kerncodierter tRNAs abhängig sind. Falls hier ein spezifischer tRNA-Import-Mechanismus vorliegt, könnten selektive Behandlungsmethoden entwickelt werden, die diesen Import blockieren (SCHNEIDER and MARÉCHAL-DROUARD, 2000; ENTELIS *et al.*, 2001).

Fazit: Der Import von tRNA-Molekülen in Mitochondrien stellt ein wachsendes Forschungsfeld dar, das nicht nur vom evolutionären Aspekt hochinteressant ist, sondern auch bei der Therapie verschiedener Krankheiten richtungsweisend sein könnte.

Literatur

- Chang, D. D. and Clayton, D. A. (1987): A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus-encoded RNA. *Science* 235: 1178–1184.
- Dietrich, A., Maréchal-Drouard, L., Carneiro, V., Cosset, A., and Small, I. (1996): A Single Base Change Prevents Import of Cytosolic tRNA^{Ala} into Mitochondria in Transgenic Plants. *Plant J.* 10: 913–918.
- Doersen, C.-J., Guerrier-Takada, C., Altman, S., and Attardi, G. (1985): Characterization of an RNase P Activity from HeLa Cell Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 260: 5942–5949.
- Dörner, M., Altmann, M., Pääbo, S., and Mörl, M. (2001): Evidence for Import of a Lysyl-tRNA into Marsupial Mitochondria. *Mol. Biol. Cell* 12: 2688–2698.
- Entelis, N. S., Kolesnikova, O. A., Martin, R. P., and Tarassov, I. A. (2001): RNA delivery into mitochondria. *Adv. Drug Del. Rev.* 49: 199–215.
- Glover, K. E., Spencer, D. F., and Gray, M. W. (2001): Identification and structural characterization of nucleus-encoded transfer RNAs imported into wheat mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276: 639–648.

Kolesnikova, O. A., Entelis, N. S., Mireau, H., Fox, T. D., Martin, R. P., and Tarassov, I. A. (2000): Suppression of mutations in mitochondrial DNA by tRNAs imported from the cytoplasm. *Science* 289: 1931–1933.

LeBlanc, A. J., Yermovsky-Kammerer, A. E., and Hajduk, S. L. (1999): A nuclear encoded and mitochondrial imported dicistronic tRNA precursor in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 274: 21071–21077.

Magalhaes, P. J., Andreu, A. L., and Schon, E. A. (1998): Evidence for the presence of 5S rRNA in mammalian mitochondria. *Mol. Biol. Cell* 9: 2375–2382.

Mireau, H., Cosset, A., Marechal-Drouard, L., Fox, T. D., Small, I. D., and Dietrich, A. (2000): Expression of Arabidopsis thaliana mitochondrial alanyl-tRNA synthetase is not sufficient to trigger mitochondrial import of tRNA^{Ala} in yeast. *J. Biol. Chem.* 275: 13291–13296.

Neupert, W. (1997): Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 863–917.

Rossmannith, W. and Karwan, R. M. (1998): Impairment of tRNA processing by point mutations in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) associated with mitochondrial diseases. *FEBS Lett.* 433: 269–274.

Rubio, M. A., Liu, X., Yuzawa, H., Alfonso, J. D., and Simpson, L. (2000): Selective importation of RNA into isolated mitochondria from *Leishmania tarentolae*. *RNA* 6: 988–1003.

Scheffler, I. E.: Mitochondria. Wiley-Liss, New York, 1999.

Schneider, A. and Maréchal-Drouard, L. (2000): Mitochondrial tRNA import: are there distinct mechanisms? *Trends Cell Biol.* 10: 509–513.

Schon, E. A., Bonilla, E., and DiMauro, S. (1997): Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29: 131–149.

Suyama, Y. (1967): The Origins of Mitochondrial Ribonucleic Acids in *Tetrahymena pyriformis*. *Biochemistry* 6: 2829–2839.

Tarassov, I., Entelis, N., and Martin, R. P. (1995): Mitochondrial import of a cytoplasmic lysine-tRNA in yeast is mediated by cooperation of cytoplasmic and mitochondrial lysyl-tRNA synthetases. *EMBO J.* 14: 3461–3471.

Tarassov, I. A. and Martin, R. P. (1996): Mechanisms of tRNA import into yeast mitochondria: an overview. *Biochimie* 78: 502–510.

Korrespondenzadresse:

Dr. rer. nat. habil. Mario Mörl
Dr. rer. nat. Heike Betat
Max-Planck-Institut für Evolutionäre Anthropologie
Inselstr. 22
D-04103 Leipzig
Tel.: 0341 99 52 507